

Ekstrak Daun *Annona muricata* Linn. sebagai Antiproliferasi terhadap Sel Hepar Tikus Terinduksi 7,12 Dimetilbenz [a] antracene (DMBA)

Rosa Adelina¹ Rahmi Febriyanti², Intan Sari Oktoberia¹, Putri Reno Intan¹

¹Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Kemenkes RI

²Universitas Islam Negeri SUSKA Riau,

email: rosa.adelina@safro.net

Diterima: 8 Oktober 2013

Direvisi: 20 November 2013

Disetujui: 3 Desember 2013

Abstract

Annona muricata Linn. or soursop contains acetogenin which can induce apoptotic in in vitro assay and has cytotoxic effect. The study has been done to examine the soursop leaves extract's potency in in vivo assay to suppress tumor development by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced. The induction process has been done twice a week for five weeks to white rat, Sprague Dawley's strain. The soursop leaves extract were given into three doses, 200, 400, and 800 mg/kgBW, for seventeen days after two weeks induction with DMBA. The analysis of histopathology and the study of proliferation activity of hepatic cell with AgNOR showed significant reduction of proliferation activity. In conclusion, the soursop leaves extract has potency as antiproliferative agent to hepatic tumor in in vivo study.

Keywords : *Antiproliferation, Annona muricata leaves extract, Hepatic tumor*

Abstrak

Annona muricata Linn. atau sirsak yang mengandung senyawa golongan acetogenin mampu menginduksi apoptosis pada secara *in vitro* dan bersifat sitotoksik. Telah dilakukan penelitian untuk membuktikan potensi ekstrak daun sirsak secara *in vivo* dalam menghambat perkembangan tumor hepar akibat induksi senyawa kimia 7,12 dimetilbenz [a] antracene (DMBA). Induksi dilakukan selama dua kali seminggu selama lima minggu, pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Sprague Dawley. Ekstrak daun sirsak diberikan dengan tiga peringkat dosis, yaitu 200, 400, dan 800 mg/kg BB, selama tujuh belas hari setelah dua minggu pemberian DMBA. Hasil pemeriksaan histopatologi dan penentuan aktivitas proliferasi sel hepar dengan AgNOR menunjukkan adanya penurunan aktivitas proliferasi sel hepar secara signifikan. Disimpulkan bahwa ekstrak daun sirsak berpotensi sebagai antiproliferasi pada tumor hepar secara *in vivo*.

Kata kunci: *Antiproliferatif, Ekstrak daun Annona muricata Linn., Tumor hepar*

Pendahuluan

Kematian akibat kanker menunjukkan insiden yang tinggi di dunia dan semakin meningkat setiap tahunnya. Menurut WHO, jumlah penderita kanker setiap tahun bertambah sekitar tujuh juta orang, dan dua per tiga di antaranya berada di negara-negara yang sedang berkembang. Jika tidak dikendalikan, diperkirakan 26 juta orang akan menderita kanker dan 17 juta orang meninggal karena kanker pada tahun 2030. Ironisnya, menurut *Union for International Cancer Control* tahun 2009, kejadian ini akan terjadi lebih cepat di negara miskin dan berkembang.¹ Di Amerika Serikat, lebih dari 12.000 jumlah kematian per tahun terkait dengan kanker hepar.² Berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013, prevalensi kanker di Indonesia adalah 1,4 per 1000.³ Di Indonesia, insiden kanker pada laki-laki adalah 11:100.000, wanita 3:100.000 penduduk, dan kanker hepar merupakan penyebab kanker ketiga terbesar untuk laki-laki.⁴ Tingkat insidens kanker hepar pada laki-laki tiga kali lebih tinggi daripada wanita dan dari tahun 2005-2009 angka insidens meningkat menjadi 2,3% per tahun pada laki-laki dan 1,3% pada wanita.⁵

Sebanyak 80% dari 30.640 kasus kanker hepar yang diperkirakan terjadi di Amerika Serikat merupakan kasus *hepatocellular carcinoma* (HCC) yang terbentuk dari sel hepatosit yang merupakan tipe sel paling banyak yang terdapat di hepar. Beberapa gejala umum kanker hepar adalah sakit pada bagian perut, kehilangan berat badan, kehilangan nafsu makan, *jaundice*/kulit berwarna kuning, dan demam. Selain itu terjadi pembesaran volume hepar. Beberapa faktor risiko kanker hepar adalah sirosis yang diakibatkan konsumsi alkohol, hepar berlemak yang diakibatkan obesitas pada komunitas yang nonalkoholik, serta infeksi kronis virus hepatitis B dan C (HBC dan HCV).⁵

Umumnya pengobatan kanker dilakukan dengan mengangkat jaringan kanker dengan operasi atau dengan mematikan sel kanker. Kedua cara ini tidak dapat mengatasi kanker yang sudah mengalami metastasis. Pengangkatan jaringan kanker pada umumnya tidak bisa tuntas menghilangkan kanker karena kemungkinan ada jaringan yang masih tertinggal dan dapat tumbuh menjadi jaringan kanker baru. Terapi kemoterapi dan radioterapi kurang selektif dalam membunuh sel kanker, seringkali sel normal juga ikut rusak dan mati sehingga tidak aman untuk sel normal.⁶ Oleh karena itu, pilihan pengobatan baru yang aman, efektif dan selektif untuk penyakit kanker sangat penting untuk diteliti.⁷ Penemuan obat baru antikanker yang dilakukan dengan mengeksplorasi bahan alam sangat berpotensi untuk dikembangkan.⁸

Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan senyawa-senyawa dalam tanaman dapat menghambat atau bahkan membunuh sel kanker sehingga berpotensi sebagai agen antikanker.⁹ Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antikanker adalah daun sirsak (*Annona muricata* L.). Daun sirsak mengandung senyawa golongan *acetogenin*, minyak esensial, *reticuline*, *loreximine*, *coclaurine*, *annonurine*, dan *higenamine*. Golongan senyawa *acetogenin* adalah komponen fitokimia dalam daun sirsak yang memiliki potensi sebagai antikanker^{10,11} dan daun sirsak mengandung hingga 17 senyawa *acetogenin* yang memiliki efek sitotoksik.¹² *Bullatacin* yang juga termasuk golongan *acetogenin* terbukti dapat menginduksi apoptosis (kematian sel terprogram) pada hepatoma.¹³ Pada beberapa waktu yang lalu, berita daun sirsak dapat menyembuhkan kanker sangat meluas namun penelitian yang sudah dilakukan baru sampai pada tahap *in vitro*. Oleh karena itu, dilakukan penelitian *in vivo* untuk membuktikannya menggunakan hewan coba tikus untuk uji antikanker.¹⁴

Penelitian ini menelusuri potensi daun sirsak sebagai agen antiproliferatif dan pemicu apoptosis pada tikus terinduksi 7,12-dimetilbenz[*a*]anthracene (DMBA).

Metode

Bahan uji karsinogenesis

Daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) didapatkan dari daerah Tangerang Selatan dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu tidak lebih dari 60°C. Bahan untuk pembuatan preparat histopatologi dengan Haematoksilin Eosin adalah sebagai berikut: formalin 10% (Asia Lab), *xylene*, etanol absolut (Gibco), mayer hematoksilin (Sigma), eosin (Sigma), poly L lysin (Sigma), *phosphate buffer saline* (PBS) (Sigma), hidrogen peroksida, *citrate buffer*, *normal serum*, antibodi COX dan VEGF, *Biotinylated Goat Anti-polyvalent*, DAB (Sigma), streptavidine, aquadest (Asia Lab), balsem Kanada. Bahan untuk pemeriksaan aktivitas proliferasi dengan metode AgNOR adalah preparat histologi jaringan hepar, *xylene*, buffer sodium sitrat, larutan natrium tiosulfat 5%, larutan pengecatan perak (1 bagian volume gelatin, 2% dalam asam formiat 1% dan 2 bagian larutan perak nitrat 50%).

Hewan coba

Hewan uji yang digunakan adalah 30 ekor tikus betina galur *Sprague Dawley* umur ± 40 hari¹⁵ dengan berat badan 30-60 gram, diperoleh dan dipelihara di laboratorium hewan coba Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan. Ketentuan besar sampel dihitung berdasarkan rumus:¹⁶

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan:

t = banyaknya kelompok perlakuan (t=5)
r = jumlah replikasi/ jumlah sampel dalam satu kelompok (sehingga $r \geq 5$)

Desain penelitian

Penelitian ini memiliki desain penelitian eksperimental.

Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium hewan coba Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes selama delapan bulan.

Ekstraksi daun sirsak (*Annona muricata* Linn.)

Simplisia kering diblender kasar dan diekstraksi menggunakan metode remaserasi menggunakan etanol 96%.¹² Proses remaserasi yang dilakukan adalah satu bagian simplisia dibasahi dengan dua puluh bagian etanol 96% dan ditutup selama tiga hari terlindung dari cahaya dengan diaduk setiap harinya. Setelah tiga hari, hasil maserasi diserkai dan disaring dua kali menggunakan kain dan kertas Wheatman sehingga tidak ada ampas yang terikut. Ampas dibasahi kembali dengan sepuluh bagian etanol 96% dan ditutup dua hari terlindung dari cahaya dan diaduk setiap harinya. Maserat disaring menggunakan kertas saring. Maserat yang didapatkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental daun sirsak.¹⁷ Untuk pembuatan model kanker hepar digunakan DMBA (Sigma).

Induksi karsinogenesis menggunakan DMBA dan perlakuan dengan ekstrak daun sirsak

Tiga puluh ekor tikus betina umur 40 hari dibagi menjadi 5 kelompok secara random. Kelompok I digunakan sebagai kelompok kontrol negatif, diberi makanan pelet dan diberikan larutan CMC-Na 0,5% selama proses perlakuan. Kelompok II merupakan kelompok kontrol DMBA, yang diberikan DMBA (20 mg/kgBB yang dilarutkan dengan minyak jagung) selama

proses induksi karsinogenesis dan diberikan pelet saja selama proses perlakuan. Kelompok III, IV, dan V merupakan kelompok ekstrak dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB yang diberikan selama proses perlakuan. Induksi menggunakan DMBA dilakukan pada kelompok kontrol DMBA dan ekstrak selama lima minggu pertama (minggu ke-0 s/d ke-5) secara oral menggunakan sonde dua kali seminggu (hari ke-1 dan ke-4). Pada dua minggu berikutnya (minggu ke-6 dan ke-7) kelima kelompok tidak diberikan perlakuan untuk menunggu tumornya tumor namun tetap diberikan makan dan minum ad libitum dan selama 17 hari berikutnya dilakukan pemberian CMC-Na 0,5% pada kelompok I dan ekstrak daun sirih pada kelompok III, IV, dan V. Pada akhir perlakuan, seluruh tikus dikorbankan menggunakan ketamine dan dilakukan pengambilan organ hepar.^{12,14} Keseluruhan proses uji in vivo terdapat dalam Gambar 1.

Pewarnaan dan pemeriksaan histopatologi dengan Haematoksilin Eosin (HE)

Pembuatan pewarnaan Haematoksilin Eosin dilakukan melalui enam tahap perlakuan, yaitu fiksasi, dehidrasi, *clearing*, infiltrasi, *embedding*, dan *sectioning*. Pengamatan dilakukan terhadap gambaran mikroskopis sel hepar berupa perubahan gambaran sel normal-abnormal lalu dikelompokkan dan diskoring (skor 0 untuk nilai normal dan skor 1 untuk nilai abnormal). Pengamatan dilakukan sebanyak 10 lapang pandang.

Pewarnaan dan pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan AgNOR

Pewarnaan AgNOR dilakukan dengan cara preparat histologi jaringan hepar diimersikan dalam buffer sodium sitrat (pH 6,0) kemudian diinkubasi dalam autoklaf

pada suhu 120°C (tekanan 1,1-1,2) selama 20 menit.

Setelah didinginkan sampai suhu 37°C, *slide* kemudian diimersikan ke dalam larutan pengecatan perak yang terdiri dari 1 bagian volum gelatin 2% dalam asam formiat 1% dan 2 bagian larutan perak nitrat 25% dalam lingkungan yang terkontrol suhunya yaitu pada suhu 37°C selama 11 menit. Reaksi dihentikan dengan mencuci *slide* menggunakan aqua bi-distilata dan di dehidrasi menggunakan etanol 96% dengan konsentrasi yang dinaikkan secara bertingkat, dibersihkan dengan *xylene* dan ditempelkan pada resin.

Pemeriksaan dilakukan secara kuantitatif yaitu dengan menghitung *black dot* yang dikonversikan ke nilai mAgNOR. Pengamatan *black dot* dilakukan sebanyak 10 lapang pandang dengan mikroskop cahaya perbesaran 1000X dalam minyak imersi. Hasil perhitungan *black dot* dikonversikan ke nilai mAgNOR, yaitu jumlah seluruh *black dot* pada 250 sel kemudian diratarata dengan cara membagi jumlah seluruh *black dot* dengan jumlah sel yang diamati.

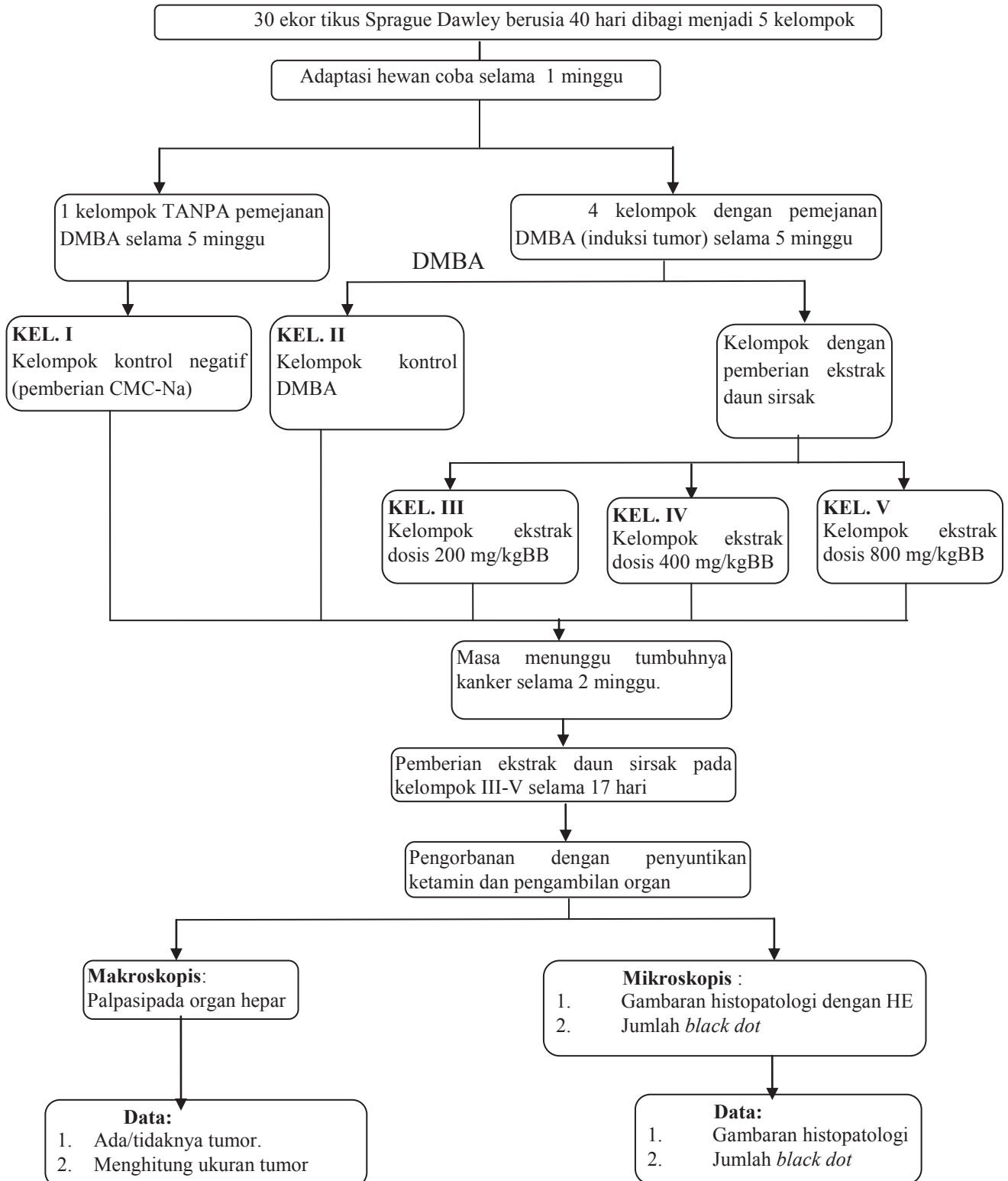
Analisis Data

Data dianalisis secara statistik menggunakan *oneway* ANOVA, dengan syarat bila jumlah *black dot* di tiap-tiap kelompok terdistribusi normal dengan variasi homogen. Uji normalitas dan homogenitasnya menggunakan Kolmogorov Smirnov dilanjutkan dengan uji Tuckey. Tingkat kepercayaan ditentukan 95%.

Persetujuan Etik

Penelitian ini sudah disetujui oleh Komisi Etik Badan Litbangkes dengan nomor persetujuan etik KE.01.03/EC/151/-2012.

Alur Penelitian



Gambar 1. Alur Penelitian

Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi ekstrak etanolik daun sirsak sebagai antiproliferasi pada tikus putih terinduksi DMBA. DMBA merupakan hidrokarbon polisiklik aromatik yang dioksidasi menjadi 7,12-DMBA-3,4 oksida oleh enzim sitokrom P450 (CYP) yang akan dihidrolisis menjadi bentuk diolnya dan dioksidasi kembali oleh sitokrom P450 menjadi 7,12-DMBA-3,4 oksidadio 1-1,2 epoksida yang merupakan karsinogen.¹⁸ Metabolit DMBA bersifat toksik dan menyebabkan stress oksidatif yang akan mengarah kepada kerusakan struktur sel dan dapat menyebabkan nekrosis sel.¹⁹ Pemberian DMBA menyebabkan peningkatan laktat dehidrogenase yang diikuti dengan nekrosis.²⁰ Pada penelitian ini, sebanyak 501,9 gram daun sirsak memerlukan 10 L etanol 96% dan didapatkan hasil 34, 8750 gram ekstrak kental. Dengan demikian diperoleh rendemen ekstrak sebesar 6,95%.

Pengamatan sel hepar tikus menggunakan pewarnaan Haematoksilin Eosin (HE) yang dimaksudkan untuk melihat gambaran histopatologi organ hepar dari kelima kelompok tikus. Hasil pembacaan histopatologi menunjukkan pada kelompok kontrol negatif struktur hepatosit teratur, inti sel monokromatik berwarna biru, gambaran mikroskopik sel hepar merupakan gambaran normal dari sel hepar dengan ciri-ciri hepatosit tersusun secara teratur dan inti sel berwarna biru. Pada kelompok kontrol positif (DMBA) terjadi abnormalitas sel berupa pelebaran sinusoid diffus (perilobular, midzona, sentrolobuler) dan struktur hepatosit terlihat mengecil serta terjadi fokus degenerasi dan nekrosis, inti sel pecah (*multiple nukleoli*). Dengan perubahan seperti yang diuraikan sebelumnya dapat dikatakan pada kelompok kontrol positif terjadi abnormalitas sel hepar yang dikenal *acute diffuse severe*

hepatic necrosis. Pada kelompok dosis 200 mg/kg BB terjadi pelebaran sinusoid diffuse, struktur hepatosit masih teratur namun tampak mengecil, serta bentuk inti sel monokromatik (normal), fokus degenerasi hepatosit. Perubahan yang terjadi disebut *moderate and acute multifocal hepatic degeneration*. Pada kelompok dosis 400 mg/kg BB terjadi pelebaran sinusoid *diffuse*, struktur hepatosit tidak teratur, degenerasi dan fokus nekrosis hepatosit, inti sel terlihat pecah. Pada kelompok ini inti sel sudah tidak monokromatik lagi karena inti sel telah pecah, tapi masih dikatakan *moderate and acute multifocal hepatic degeneration*. Pada kelompok dosis 800 mg/kg BB terjadi pelebaran sinusoid *diffuse*, namun struktur hepatosit masih teratur, degenerasi nekrosis hepatosit, tingkat keparahan sama dengan kelompok dosis 400 mg/kgBB (Gambar 2).

Gambar 2 menunjukkan bagaimana DMBA dapat menyebabkan perubahan struktur sel hepatosit dan memicu terjadinya nekrosis. Pada Gambar 2 juga terlihat ekstrak daun sirsak mampu mengurangi tingkat abnormalitas sel hepar dari *severe* pada kelompok kontrol DMBA menjadi *moderate* pada kelompok ekstrak. Namun demikian, ekstrak daun sirsak belum mampu memulihkan secara total abnormalitas sel yang rusak akibat DMBA. Penelitian terkait karsinogenesis yang dilakukan oleh Alisah dkk. yang menggunakan induksi DMBA juga menunjukkan bahwa DMBA mampu menyebabkan nekrosis dan tumor hepar.²¹

Secara statistik, data diuji homogenitasnya dengan uji Kolmogorov Smirnov dan menunjukkan bahwa data terdistribusi normal, dengan nilai signifikansi *homogeneity of variances* sebesar 0,577. Karena data yang dianalisis terdistribusi normal, digunakan metode statistik parametrik

dengan uji One Way ANOVA. Hasil analisis menunjukkan DMBA mampu menyebabkan abnormalitas pada sel normal dan masih terdapat abnormalitas sel pada kelompok ekstrak akibat pemberian DMBA. Kemampuan ekstrak meningkat sesuai dosis dan menunjukkan efek yang bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol DMBA. Selain itu, kelompok ekstrak mampu mengurangi tingkat abnormalitas akibat pemaparan DMBA namun belum mampu mengembalikan abnormalitas sel ke kondisi normal (Tabel 1).

Selain pengamatan histopatologi, pada penelitian ini juga dilakukan pengamatan proliferasi sel dengan melakukan penghitungan skor AgNOR untuk membedakan antara hepar yang normal dan hepar yang terinsidensi tumor. Untuk menentukan aktivitas proliferasi sel tumor, maka dilakukan teknik pewarnaan perak (AgNOR) pada NOR (*Nuclear Organizer Region*). NOR adalah pita DNA pada tangan pendek kromosom akrosentrik yang berhubungan dengan aktivitas genribosomal RNA, sintesis protein, dan proliferasi sel. Preparat AgNOR digunakan untuk mengamati tingkat proliferasi sel hepar baik yang terkena tumor ataupun normal (Gambar 3).

Secara statistik, data diuji homogenitasnya dengan uji Kolmogorov Smirnov dan menunjukkan bahwa data jumlah *black dot* terdistribusi normal, dengan nilai signifikansi *homogeneity of variances* sebesar 0,986.

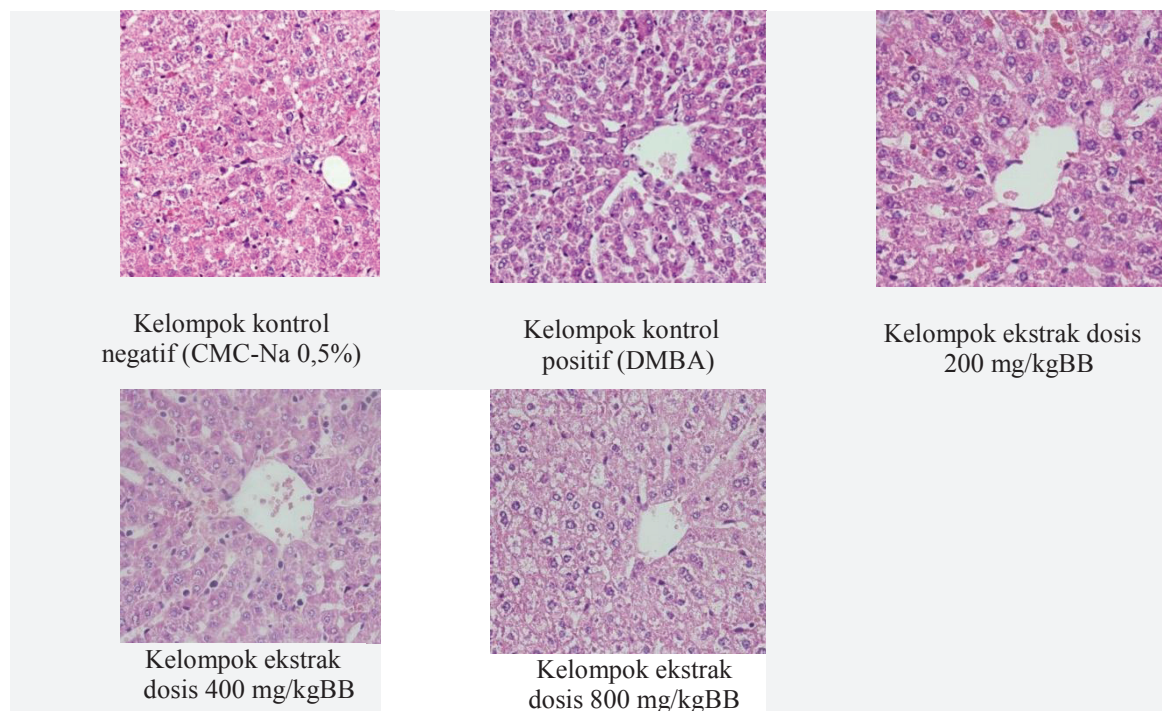
Hasil analisis statistik *One Way ANOVA* dan *Post Hoc Test Uji Tuckey HSD* taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa angka mAgNOR hepar antara kelompok kontrol positif berbeda signifikan dengan angka mAgNOR kelompok perlakuan kontrol negatif dan kelompok ekstrak dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB. Hal ini me-

nandakan aktivitas proliferasi yang paling tinggi terjadi pada kelompok perlakuan DMBA. Angka mAgNOR antara kelompok kontrol negatif dan kelompok ekstrak 800 mg/kgBB tidak berbeda signifikan, artinya aktivitas proliferasi antara keempat kelompok tersebut mendekati sama sedangkan angka mAgNOR antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok ekstrak 200 dan 400 mg/kgBB berbeda signifikan yang memiliki arti ekstrak dengan kedua dosis ini mampu menurunkan tingkat proliferasi sel namun tidak dapat mengembalikan aktivitas proliferasi sel ke tingkat normalnya seperti kelompok ekstrak 800 mg/kgBB (Tabel 2).

Penelitian *in vitro* sebelumnya menunjukkan golongan senyawa *acetogenin* mampu berperan sebagai sitotoksik¹² dan salah satu senyawanya, *bullatacin*, mampu menginduksi apoptosis (kematian sel terprogram) pada hepatoma.¹³ Pada penelitian ini ekstrak daun sirsak yang mengandung senyawa golongan *acetogenin* mampu menurunkan angka *blackdot* secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol DMBA. Kanker sendiri merupakan penyakit yang kompleks dan melibatkan banyak sekali protein regulator yang terlibat pada jenis kanker yang berbeda. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa mekanisme ekstrak daun sirsak salah satunya adalah menghambat tingkat proliferasi sel kanker hepar. Salah satu mekanisme molekuler yang terlibat dalam kerja ekstrak daun sirsak adalah dengan menghambat protein Bcl-2 yang merupakan salah satu protein anti-apoptosis. Pada penelitian sebelumnya menggunakan metode *in silico* menunjukkan bahwa asimicin, bullatacin, dan annonacin yang merupakan *acetogenin* dalam daun sirsak dapat bertindak sebagai inhibitor Bcl-2 sehingga *acetogenin* dapat berperan sebagai senyawa yang memicu apoptosis sel kanker.²² Selain itu, golongan *acetogenin* juga dapat menghambat

Proliferasi sel pada fase G1.¹¹ Namun demikian, berdasarkan hasil penelitian ini masih diperlukan pemurnian terhadap golongan senyawa *acetogenin* sehingga efek antiproliferasi yang terjadi dapat lebih baik sehingga bisa didapatkan dosis terapeutik yang sesuai dan masih dibutuhkan waktu

pemberian ekstrak yang lebih lama untuk mendapatkan hasil yang maksimal. Berdasarkan data-data penelitian, ekstrak daun sirsak menjanjikan sebagai agen anti-proliferasi pada kanker hepar pada dosis 200,400, dan 800 mg/kg BB.



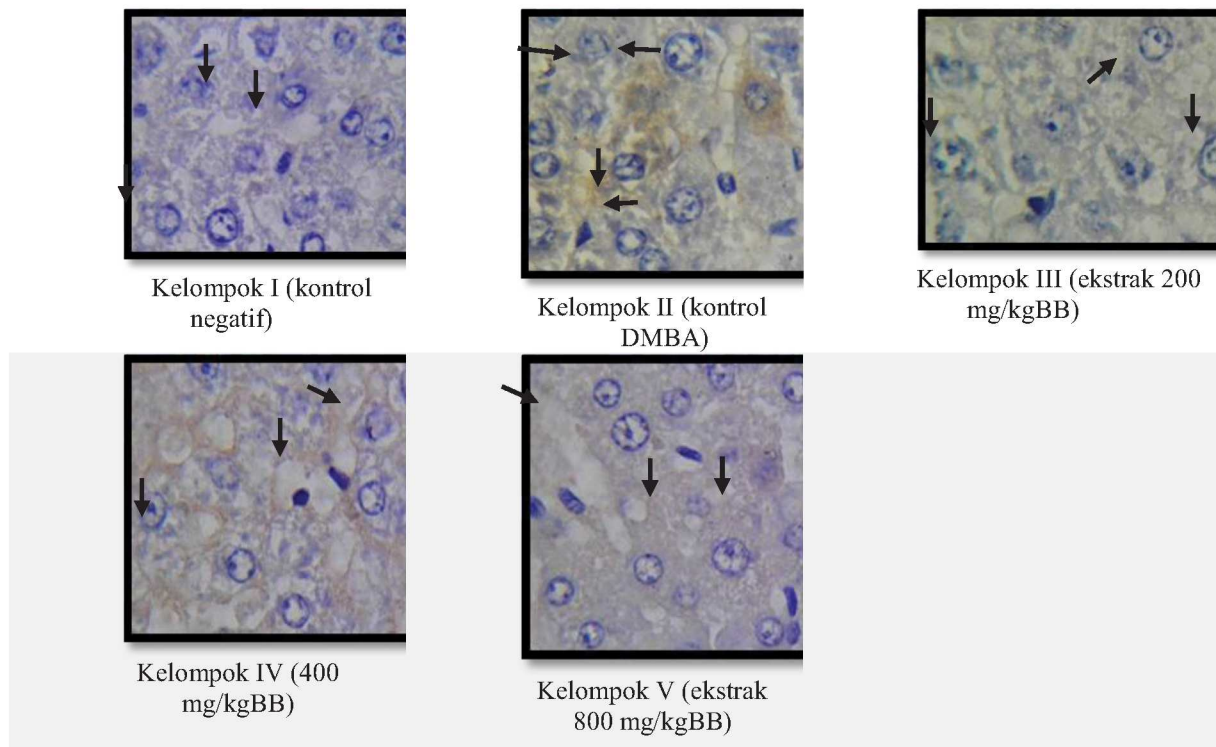
Gambar 2. Hasil pewarnaan Haematoksilin-Eosin kelima kelompok percobaan. Pembacaan dilakukan dengan pembesaran

Tabel 1. Hasil skoring pengamatan histopatologi organ hepar

Kelompok Tikus	Rata-rata skor \pm SD organ Hepar
Kontrol Negatif	0.0000 \pm 0.0000*
Kontrol DMBA	1.0000 \pm 0.0000 ^a
Ekstrak 200mg/kgBB	0.8400 \pm 0.0894* ^a
Ekstrak 400mg/kgBB	0.5600 \pm 0.0548* ^a
Ekstrak 800mg/kgBB	0.3400 \pm 0.0548* ^a

Cat: * ada perbedaan bermakna dibandingkan kontrol positif

^a ada perbedaan bermakna dibandingkan kontrol negatif



Gambar 3. Hasil perwarnaan AgNOR pada kelima kelompok percobaan. Pembacaan dilakukan dengan pembesaran 1000×

Tabel 2. Hasil analisis mAgNOR hepar menggunakan *One way Anova*

Kelompok Tikus	Rata-rata <i>blackdot</i> ± SD pada Organ Hepar
Kontrol Negatif	1.195 ± 0.1393*
Kontrol Positif	2.484 ± 0.2509 ^a
Ekstrak 200mg/kgBB	1.965 ± 0.1685* ^a
Ekstrak 400mg/kgBB	1.838 ± 0.2194* ^a
Ekstrak 800mg/kgBB	1.451 ± 0.1440*

Cat: * ada perbedaan bermakna dibandingkan kontrol positif

^a ada perbedaan bermakna dibandingkan kontrol negatif

Kesimpulan dan Saran

Ekstrak daun sirsak mampu menghambat proliferasi sel tumor hepar secara bermakna pada tikus putih yang diinduksi 7,12-di-metilbenz [a] antracene pada dosis 200, 400, dan 800 mg/kg BB dengan efek meningkat sesuai dosis. Adapun saran dari penelitian adalah perlunya pemurnian senyawa acetogenin sehingga didapatkan dosis terapetikanya.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Kesehatan yang telah membiayai penelitian ini melalui hibah Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) tahun 2012, tim di Laboratorium Farmasi dan Laboratorium Hewan Coba atas bantuan selama penelitian berlangsung.

Daftar Rujukan

1. Yayasan Kanker Indonesia. YKI-Jakarta Race. 2012, diunduh dari <http://yayasankankerindo-nesia.org/2012/yki-jakarta-race/>, pada tanggal 3 Desember 2013.
2. Thuluvath PJ, Choti M, Geschwind JF, Norwitz L, dan Kalloo AN. Liver cancer. 2006, diunduh dari <http://gastro.nts.-jhu.edu>, pada tanggal 3 Desember 2013.
3. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Penyajian pokok-pokok hasil riset kesehatan dasar 2013. 2013, diunduh dari <http://terbitan.litbang-depkas.go.id/penerbitan/index.php/blp/catalog/book/48>, pada tanggal 17 Januari 2014.
4. Pfizer. 2013. Pfizer Fact: The burden of cancer in Asia, diunduh dari http://www.-pfizer.com/-files/products/cancer_in_asia.pdf, pada tanggal 17 Januari 2014.
5. American Cancer Society. Cancer facts & figures 2013. 2013, di unduh dari <http://www.cancer.org/research/cancerfactsfigures/cancerfactsfigures/cancer-facts-figures-2013>, pada tanggal 17 Januari 2014
6. King RJB, Cancer biology, 2nd Ed., London: Pearson Eduation Limited; 2000.
7. Gibbs JB. Anticancer drug targets: growth factor and growth factor signaling. Journal of Clinical Investigation 2000;105 (1): 9-13., diunduh dari <http://www.ncbi.nlm.-nih.gov/pmc/articles/PMC382594/pdf/JCI0009084.pdf>, pada tanggal 3 Desember 2013.
8. Walaszek Z, Hanausek M, dan Slaga TJ. Mechanisms of lung cancer chemoprevention by D-Glucarate, Supplement American College of Physicians 2004; 125:128-133, diunduh dari [http://toxsci.oxfordjournals.org/external-ref?access_num=10.1016/02715317\(96\)00045-0&link_type=DOI](http://toxsci.oxfordjournals.org/external-ref?access_num=10.1016/02715317(96)00045-0&link_type=DOI), diunduh pada tanggal 3 Desember 2013.
9. Umadevi M, Kumar KPS, Bhowmik D, dan Duraivel S. Traditionally used anticancer herbs in India. Journal of Medicinal Plants Studies 2013;1 (3):56-74, diunduh dari http://www.plantsjournal.com/vol1Issue1/Issue_may_2013/7.pdf, pada tanggal 22 Januari 2014.
10. Chang FR dan Wu YC. Novel cytotoxic annonaceousacetogenins from *Annona muricata*. Journal of Natural Product 2001;64:925-31, diunduh dari <http://pubs.-acs.org/doi/abs/-11021/np010035s>, pada tanggal 3 Desember 2013.
11. Yuan SF, Chang H, Chen H, Yeh Y, Kao Y, Lin K, Wu Y, dan Su J, Annonacin, a mono-tetrahydrofuranacetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway, Life Science 2003;72(25):2853-286, diunduh dari <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320503001905>, pada tanggal 4 Desember 2013.
12. Kim G, Zeng L, Alali F, Rogers LL, Wu F, McLaughlin JL, dan Sastrodihardjo S. Two new Mono-Tetrahydrofuran ring acetogenins, anno-muricin E and muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. Journal of Natural Product 1998;61(4):432-436, diunduh dari <http://www.aseanbiodiversity.info/abstract/53004594.pdf>, pada tanggal 3 Desember 2013.
13. Chih H, Chiu HF, Tang KS, Chang FR, dan Wu YC. Bullatacin, a potent antitumour annonaceousacetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction. Life Science 2001;-69:1321-31, diunduh dari <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320501012097> pada tanggal 4 Desember 2013.

14. Meiyanto E, Susilowati S, Tasminatun S, Murwanti R, dan Sugiyanto. Penghambatan karsinogenesis kanker payudara tikus ter-induksi DMBA pada fase post inisiasi oleh ekstrak-etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour), Merr. Majalah Farmasi Indonesia 2007;18(4):169-175.
15. Singletary K, MacDonald, Iovinelli M, Fischer C, dan Walling M. Effect of beta-diketones diferuloylmethane (Curcumin) and di-benzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumor induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, carcinogenesis 1998;19:-1039-1043, diunduh dari <http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=9667742>, pada tanggal 3 Desember 2013.
16. Supranto J. Teknik sampling untuk survei dan eksperimen. PT Rineka Cipta, Jakarta. 2000.
17. Departemen Kesehatan RI. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 2000.
18. Shimada T dan Kuriyama FY. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. Cancer Science 2004; 95:1-6, diunduh dari <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03162.x/pdf>, pada tanggal 21 Januari 2014.
19. Patri M dan Padmini P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in air and their neurotoxic potency in association with oxidative Stress: a Brief Prespective. Annual Review of Neuroscience 2009;16:340-349, diunduh dari <http://annalsofneurosciences.org/journal/index.php/annal/article/view/43/67>, pada tanggal 22 Januari 2014.
20. Al-Attar MA. The influence of dietary grape seed oil on dMBA-induced liver enzymes disturbance in the frog, *Rana ridibunda*. Pakistan Journal of Nutritional 2004;3:304-309, diunduh dari <http://www.pjbs.org/pjnonline/fin-228.pdf>, pada tanggal 22 Januari 2014.
21. Alisah NF, Baroroh HN, dan Ekowati H. Protective effects of *Nigella sativa* Against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced carcinogenesis in rats. Universa Medica 2012;31(2): 88-95, diunduh dari http://www.univmed.org/wpcontent/uploads/2012/09/heni_e12.pdf, pada tanggal 22 Januari 2014.
22. Adelina R. Uji docking molekuler annonacin, bullatacin, dan asimicin terhadap aktivitas apoptosis. Prosiding Seminar Nasional POK-JANAS TOI XLII 2013;2:154-158. ISBN: 978-602-17758-2-0.